

Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2004



PCT/EP 02 / 14727

Mod. C.E. - 1-4-7

[Handwritten signature]

10/500270

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

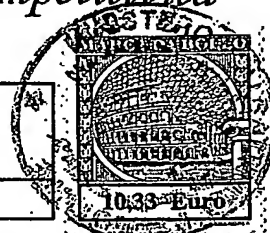
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 20 MAR 2003

WIPO

PCT



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N.

MI2002 A 001833

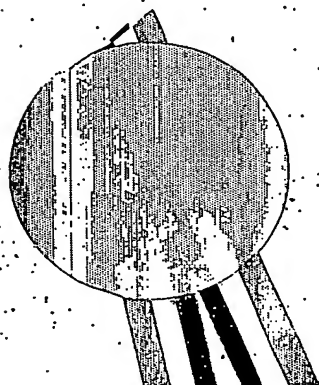
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il

17 DIC. 2002



IL DIRIGENTE

[Handwritten signature of Elena Marinelli]

Sig.ra E. MARINELLI

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **SPADAFORA CORRADO**Residenza **ROMA**

codice

SPADAFORA 48902427302) Denominazione **LAVIA PATRIZIA**Residenza **ROMA**

codice

LVAPRZ55C49H5790

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Dr. Diego Pallini ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**via **C.so di Porta Vittoria** n. **9** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo _____

Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa come induttori del differenziamento cellulare

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **SPADAFORA Corrado**3) **MATTEI Elisabetta**2) **LAVIA Patrizia**4) **NERVI Clara**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) **nessuna**

2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ PROV n. pag. **19**Doc. 2) ☒ PROV n. tav. **06**Doc. 3) ☐ RISDoc. 4) ☐ RISDoc. 5) ☐ RISDoc. 6) ☐ RISDoc. 7) ☐

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

DUECENTONOVANTINO/80.-COMPILATO IL **19/08/2002**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Diego PalliniCONTINUA SI/NO **SI**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO****MILANO**codice **1515**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 001833

Reg. A.

DUEMILADUE**DICIANNOVE****AGOSTO**

L'anno _____, il giorno _____

del mese di _____

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **01** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprarportato.**IL RAPPRESENTANTE, INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA**

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

CIRCOLARE N. 423 DEL 01.03.2002. EFFETTUA IL DEPOSITO CON RISERVA DI**LETTERA D'INCARICO.**

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01 di totali 01

DOMANDA N.

REG. A

A. RICHIEDENTE (I)

03	Denominazione	MATTEI ELISABETTA	Residenza	ROMA	codice	MTTLBT52D59H501T	PF
04	Denominazione	NERVI CLARA	Residenza	ROMA	codice	NRVCLR57457H501G	PF
05	Denominazione	LORENZINI RODOLFO NELLO	Residenza	BLERA (VT)	codice	LRNRLF56L0641435S	PF
06	Denominazione	PALOMBINI GUGLIELMO	Residenza	ROMA	codice	PLMGLL44P03E126T	PF
	Denominazione		Residenza		codice		
	Denominazione		Residenza		codice		
	Denominazione		Residenza		codice		

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
05 LORENZINI Rodolfo Nello	
06 PALOMBINI Guglielmo	

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R

SCIoglimento RISERVE

Data	N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) Diego Pallini

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI3= MI2002A 001833 REG. ADATA DI DEPOSITO 19/08/2002NUMERO BREVETTO DATA DI RILASCIO / /

D. TITOLO

Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa come induttori del differenzia-
mento cellulare

L. RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce ad inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa come induttori del differenziamento cellulare a scopo terapeutico preventivo e curativo, in particolare per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte a contrastare la perdita di differenziamento cellulare e come antitumorali.



M. DISEGNO

Descrizione della Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal
titolo: INIBITORI NON NUCLEOSIDICI DELLA TRASCRITTASI
INVERSA COME INDUTTORI DEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

a nome di: SPADAFORA Corrado

residente a: ROMA

a nome: LAVIA Patrizia

residente a: ROMA

a nome: MATTEI Elisabetta

residente a ROMA

a nome: NERVI Clara

residente a: ROMA

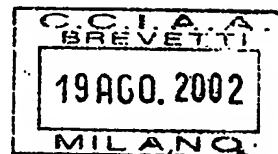
a nome: LORENZINI Rodolfo Nello

residente a: BLERA (VITERBO)

a nome: PALOMBINI Guglielmo

residente a: ROMA

inventori designati: SPADAFORA Corrado, LAVIA Patrizia, MATTEI
Elisabetta, NERVI Clara, LORENZINI Rodolfo Nello, PALOMBINI
Guglielmo



MI 2002 A 0 0 1 8 3 3

*** **

Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce ad inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa come induttori del differenziamento cellulare a scopo terapeutico preventivo e curativo, in particolare per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte a contrastare la perdita di differenziamento cellulare e come antitumorali.

A handwritten signature in dark ink, consisting of stylized, overlapping loops.

Stato dell'arte

La Trascrittasi Inversa (RT) endogena è un enzima codificato da due classi di elementi ripetuti nei genomi eucariotici: i retrotransposoni ed i retrovirus endogeni. L'espressione dei geni codificanti RT è generalmente repressa nelle cellule terminalmente differenziate non patologiche, dove è rilevabile solo ad un livello basale di espressione, mentre è al contrario attiva nelle cellule germinali, embrionali e nei tumori. Il potenziale ruolo della RT in processi biologici fondamentali, quali la proliferazione embrionale e tumorale, non è mai stato chiarito.

La nevirapina, nota anche con il termine commerciale di VIRAMUNE[®], è nota come inibitore non nucleosidico della Trascrittasi Inversa (RT) specifico per il virus HIV-1 e come tale è utilizzata in commercio. Essa ha la seguente formula bruta $C_{15}H_{14}N_4O$, allo stato puro è un solido cristallino di peso molecolare 266,302, con intervallo di fusione 247-249°C e solubilità 0,1 mg/ml in acqua e 5,5 mg/ml in etanolo e può essere preparata secondo le indicazioni presenti nel brevetto EP 429.987.

Sommario dell'invenzione

E' stato ora trovato che inibitori non nucleosidici della RT inducono il differenziamento e, in parallelo, controllano/regolano la proliferazione cellulare.

Con il termine di "inibitori della RT" si intendono, secondo la presente invenzione, quei composti che interferiscono con l'attività enzimatica attraverso un legame diretto con la molecola di RT. Ad esempio la nevirapina si inserisce in una tasca idrofobica localizzata nella sub-unità



p66 dell'RT in prossimità del sito catalitico dell'enzima la cui funzionalità, a causa del legame, è compromessa. Sono pertanto oggetto della presente invenzione i composti non nucleosidici che mostrano attività di inibizione della RT e che quindi possono essere utilizzati in terapia preventiva e/o curativa come farmaci per contrastare la perdita di differenziamento in patologie de-differenzianti e come farmaci antiproliferativi nella terapia dei tumori, ad esempio leucemie e tumori solidi quali epatoma e teratocarcinoma. In particolare l'invenzione si riferisce esplicitamente ai disponibili in commercio ed utilizzati per il trattamento dell'AIDS che hanno attività come inibitori non-nucleosidici della RT, alle relative forme farmaceutiche e dosaggi descritti. Particolarmente preferiti sono: Viramune (nevirapina) (Boeringer), Sustiva (efavirenz) (Bristol-Myer Squibb) e Rescriptor (delavirdine) (Agouron Pharmaceuticals).

I composti sopra citati, e la nevirapina come esempio particolare, nelle loro forme farmaceutiche già abitualmente usate e commercialmente disponibili, si propongono come esempio di sostanze utili per la preparazione di composizioni farmaceutiche utilizzabili nei casi in cui si debba controllare il differenziamento, contrastando al contempo la proliferazione cellulare, quindi con azione de-differenziante ed antitumorale. L'efficacia terapeutica delle molecole è da porre in relazione alla loro capacità inibitoria della RT, anche in funzione dei soggetti in trattamento.

Breve descrizione delle Figure

Fig. 1, inibizione della crescita cellulare da parte di nevirapina (1A per

cellule miogeniche C2C7, 1B per fibroblasti NIH/3T3, 1C per cellule di teratocarcinoma F9).

Fig. 2, caratterizzazione morfologica delle cellule miogeniche C2C7 ed induzione del differenziamento con nevirapina. A, C: cellule C2C7 non trattate; B, D, E: trattate con nevirapina; la miosina è visualizzata con anticorpo specifico fluorescinato (anti-MHC) (verde) mentre il DNA (blu) è colorato con Hoechst 33258.

Fig. 3, caratterizzazione morfologica delle cellule F9 (3a, 3b, 3c, 3d non trattate; 3e, 3f, 3g, 3h trattate con RA; 3i, 3l, 3m, 3n trattate con Nev).

Fig. 4, capacità differenziativa della nevirapina esaminata su cellule eritroleucemiche umane. NB4 (control: linea eritroleucemica non trattata; RA: trattate con acido retinoico; Nev: trattate con Nevirapina). HL60 (control: linea eritroleucemia HL60 non trattate; Nev: trattate con Nevirapina). AML (blasti leucemici AML non trattati; Nev: blasti leucemici AML trattati con Nevirapina).



Fig. 5A, patterns di espressione di 10 geni, codificanti cicline (ciclina D1 e D3), inibitori della crescita (p16, p21, p27, Rb-1 e Rb-2/p130), modulatori dell'apoptosi (p53, Bcl2), e proteine costitutive (beta-actina, GAPDH)

Fig. 5B, quantificazione dei dati in Fig. 5A

Fig. 6 Rilevamento di un'attività di trascrittasi inversa in diverse linee cellulari ed inibizione della reazione di trascrizione inversa da parte della nevirapina

Descrizione dettagliata dell'invenzione

In una iniziale serie di esperimenti, abbiamo trattato cellule multipotenti

F9 di teratocarcinoma murino con 350 μ M di nevirapina, un inibitore non nucleosidico della RT adoperato nella terapia anti-AIDS, ed abbiamo osservato che questa molecola causa arresto della proliferazione delle linee F9, le quali vanno incontro ad un processo di differenziazione che converte il loro fenotipo morfologico da tipicamente tumorale a differenziato. Saggi in vitro utilizzando estratti cellulari hanno dimostrato la presenza di un'attività RT in queste cellule, che è inibita dalla nevirapina in modo dose-dipendente. L'analisi di campioni di RNA, estratti da cellule trattate con nevirapina e da cellule controllo, ha dimostrato che l'esposizione delle cellule F9 alla molecola riduce il livello di espressione dei geni Ciclina D1 e D3, marcatori genici delle cellule in proliferazione.

Questi risultati avevano suggerito che: a) un'attività di RT endogena è coinvolta nel processo di trasformazione tumorale e b) la nevirapina è in grado di riconvertire le cellule murine trasformate in fenotipi normali.

Recentemente, abbiamo approfondito lo studio della capacità differenziativa della nevirapina. Abbiamo approfondito lo studio del tipo di differenziamento a cui vanno incontro le cellule multipotenti F9, e lo abbiamo esteso ad altre linee cellulari murine: cellule miogeniche C2C7 e mesenchimali embrionali della linea NIH/3T3. I nuovi risultati confermano che la nevirapina induce una significativa riduzione della proliferazione cellulare, e, in parallelo una induzione di differenziamento. L'induzione del differenziamento è dimostrata dalla comparsa di specifici marcatori biochimici assenti nelle cellule progenitrici (catena alfa del collagene IV, tipica del differenziamento dell'endoderma parietale, nelle



colture F9 trattate; miosina nelle cellule C2C7 che, dopo pre-trattamento con nevirapina, differenziano efficientemente in miotubuli scheletrici). Inoltre la differenziazione cellulare è associata ad un'estesa riprogrammazione dell'espressione genica, in particolare di geni la cui funzione è correlata al ciclo cellulare. Infine, l'attività anti-tumorale della nevirapina è stata ulteriormente caratterizzata su cellule eritroleucemiche umane. Osservazioni morfologiche, insieme a saggi funzionali ed alla caratterizzazione dell'immunofenotipo, hanno dimostrato che l'esposizione alla nevirapina di linee cellulari di leucemie mieloidi acute e di blasti primari derivati da pazienti informati, rimuove il blocco differenziativo tipico di queste cellule e ne promuove il differenziamento in direzione monocitaria. Nel loro insieme, questi risultati evidenziano un ruolo centrale della RT nel processo di trasformazione tumorale ed identificano l'RT quale bersaglio per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici anti-tumoral.

Gli esempi seguenti, unitamente alle figure allegate, sono da considerare illustrativi e non limitativi della portata dell'invenzione.

Esempio 1 - Incubazione di colture cellulari con nevirapina

Le linee cellulari F9 e NIH/3T3 sono coltivate in DMEM con 10% siero fetale, le C2C7 in DMEM con 20% siero. La nevirapina (principio puro) è dissolta in DMSO ed usata ad una concentrazione finale di 350 μ M. Le cellule sono piastrate ad una densità di circa $2,10^4$ (F9), 10^4 (NIH/3T3) e $5,10^4$ (C2C7) in piastre Petri (35 mm di diametro) e lasciate aderire alla piastra per 5-6 ore. Il terreno è quindi sostituito con terreno fresco contenente nevirapina alla concentrazione di 350 μ M. Campioni di



cellule sono prelevati ad intervalli regolari dall'inizio dell'incubazione ed utilizzati per misure di proliferazione ed analisi immunobiochimiche.

Esempio 2 - Analisi citologica ed Immunofluorescenza (IF)

Le cellule C2C7 sono coltivate per quattro giorni in presenza o assenza di nevirapina, e successivamente trasferite in DMEM contenente 2% siero fetale (mezzo di differenziamento). Dopo 48 ore le cellule sono osservate al microscopio a contrasto di fase per rilevare la formazione dei miotubuli muscolari (cellule sinciziali con 3 o più nuclei) o la persistenza di mioblasti isolati o binucleati. Colture parallele sono fissate e sottoposte ad analisi per immunofluorescenza della catena leggera della miosina, usando un anticorpo policlonale anti-miosina e, come secondario, un'anti-IgG coniugata a fluoresceina. I nuclei delle cellule sono colorati con Hoechst 33258 per evidenziare il DNA. Nelle colture F9, i cambiamenti morfologici indotti dalla nevirapina sono registrati in vivo utilizzando una telecamera collegata ad un microscopio rovesciato termostatato a 37°C (Nikon Eclipse 300, equipaggiato con una telecamera digitale), e paragonati alla morfologia delle stesse colture di controllo (non trattate) o esposte all'acido retinoico (RA), molecola con documentate capacità differenzianti. Inoltre, è analizzata la sintesi di collagene tipo IV (alfa1), un marcatore del differenziamento endoparietale, rilevato mediante un anticorpo primario specifico seguito da un secondario coniugato a fluoresceina.

Esempio 3 - Cellule di leucemia mieloide acuta umana (AML)

Cellule leucemiche sono isolate dal sangue periferico di pazienti AML che hanno dato il loro consenso informato. I blasti AML e le linee

cellulari NB4, HL60, Kasumi 1 sono coltivati in terreno RPMI 1640 con aggiunta di siero fetale (10%), e trattati con RA ($1 \mu\text{M}$) o con nevirapina ($350 \mu\text{M}$).

L'induzione di differenziamento è valutata sia per osservazione diretta al microscopio a contrasto di fase della morfologia cellulare che rilevando l'espressione di antigeni cellulari di superficie con anticorpi diretti contro CD 11b, CD 14 e CD 15.

Esempio 4 - Preparazione del lisato cellulare e test in vitro per RT

Le cellule sono raccolte dal terreno di coltura, contate e lavate due volte con PBS. Il pellet cellulare è risospeso nel rapporto di $20 \mu\text{l}/10^6$ cellule, in un tampone di lisi costituito da: Tris-HCl 10 mM pH 7,4, MgCl_2 1mM, EGTA 1mM, PMSF 0,1 mM, β -mercaptoetanololo 5 mM, CHAPS 0,5% e Glicerolo 10%. Le cellule sono lisate congelando e scongelando per tre volte in azoto liquido ed il lisato cellulare è incubato per altri 30 min in ghiaccio e quindi centrifugato per 30 min a 4°C .

L'attività RT è nel supernatante. Il test di retrotrascrizione di routine è fatto utilizzando il sistema Thermoscript RT-PCR (Invitrogen), mescolando per ogni reazione (20 μl totali) un volume del supernatante corrispondente a 6 μg di proteine (che sostituisce l'RT commerciale), 10 ng di RNA del fago MS2, 30 pmol del primer reverse specifico per MS2, i quattro deossinucleotidi (dNTP) ciascuno a $200 \mu\text{M}$, ed incubando per 45 min a 55°C . Dopo l'incubazione, 2 μl sono prelevati da ogni reazione ed amplificati in circa 30 cicli di PCR diretta utilizzando un'appropriata coppia di oligo MS2.

Esempio 5 - Estrazione dell'RNA ed analisi dell'espressione genica per



Handwritten signature

RT-PCR

L'RNA è estratto dalle cellule F9 utilizzando il kit commerciale di estrazione "Rneasy Protect Starter Kit" (Qiagen) e seguendo le istruzioni raccomandate dalla casa produttrice. Copie di cDNA sono state sintetizzate utilizzando 300 ng di RNA totale, oligo (dT) ed il sistema commerciale Thermoscript (Invitrogen). 2 µl sono amplificati per PCR diretta usando coppie di oligonucleotidi, diretti e reverse, specifici per ogni gene analizzato.

Esempio 6 - Rallentamento dell'attività proliferativa e differenziamento indotto dalla nevirapina in cellule di teratocarcinoma F9, in precursori miogenici C2C7 ed in precursori mesenchimali NIH/3T3

Abbiamo trattato con nevirapina tre tipi cellulari murini: precursori miogenici C2C7, cellule embrionali mesenchimali NIH/3T3 e cellule multipotenti di teratocarcinoma F9, e le abbiamo incubate in parallelo con altre di controllo in assenza della molecola. Campioni di cellule sono stati prelevati da ciascuna coltura a vari tempi dell'inizio del trattamento e utilizzati per valutare la proliferazione cellulare, calcolando il numero di duplicazioni cellulari (cell doublings) nel tempo. I risultati riassunti nella Figura 1 dimostrano come la crescita cellulare sia fortemente inibita dalla nevirapina (linea intera) rispetto a cellule di controllo (linea tratteggiata). In particolare la crescita delle C2C7 e le NIH/3T3 è ridotta di circa 2,5-3 volte rispetto ai controlli mentre quella delle F9 è ridotta di circa 5 volte.

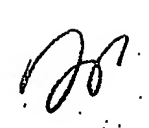
La caratterizzazione morfologica delle cellule C2C7 (Figura 2) e F9 (Figura 3) per microscopia a contrasto di fase e per immunofluorescenza

(IF) è stata effettuata comparativamente a colture di controllo non esposte a nevirapina e, nel caso delle F9, anche in paragone a colture differenziate in vitro con Acido Retinoico (RA). La Figura 2 mostra che le cellule C2C7 trattate con nevirapina hanno una marcata tendenza a fondersi formando miotubi multinucleati (Figura 2D). Inoltre, nelle cellule trattate con nevirapina la sintesi della miosina (MHC, myosin heavy chain), un marcatore del differenziamento muscolare, è notevolmente aumentata (Figura 2B) (fluorescenza verde) in confronto alle cellule di controllo non trattate con nevirapina (Figura 2A). La sintesi della miosina è già attivata in mioblasti isolati in colture pre-esposte a nevirapina ma non nei controlli (Figura 2E). Pertanto si può concludere che l'esposizione alla nevirapina induce e/o accelera il differenziamento delle C2C7 da mioblasti in miotubi.

Anche le cellule F9 di teratocarcinoma murino sono indotte a differenziare dalla nevirapina. Le F9 hanno infatti una morfologia rotondeggiante con tendenza a formare aggregati (Figura 3A), che si modifica in un caratteristico aspetto stellato se differenziate con RA (Figura 3E) ed anche in seguito ad esposizione alla nevirapina (Figura 3I). La riorganizzazione morfologica è accompagnata dalla sintesi del collagene tipo IV (alfa1), un marcatore del differenziamento, nelle cellule trattate con nevirapina (Figura 3K) e con RA (Figura 3G), mentre è assente nelle F9 controllo (Figura 3C).

Esempio 7 - Differenziamento indotto da nevirapina in linee cellulari leucemiche ed in blasti da leucemia mieloide acuta (AML)

La capacità differenziativa della nevirapina è stata esaminata su cellule



eritroleucemiche umane. A questo scopo sono state utilizzate due linee cellulari, NB4 ed HL60 ed i blasti prelevati da un paziente affetto da AML.

In tutti e tre i casi, dopo 5 giorni di trattamento (Figura 4, pannelli Control), la nevirapina rimuove il blocco differenziativo dei blasti leucemici, inducendo la comparsa di cellule con una morfologia mielomonocitica (Figura 4, pannelli Nev). L'attivazione del processo differenziativo è confermata dall'aumentata espressione di tre antigeni (marcatori del differenziamento) nelle linee cellulari NB4 e HL60: CD11b (marcatore del differenziamento granulocitico), CD14 (monocitico) e CD15 (mielomonocitico). Come si vede in Tabella 1, il trattamento con nevirapina stimola fortemente l'espressione del marcatore CD15 ed, in misura minore, di CD11b e CD14. Pertanto la nevirapina induce l'espressione del marcatore di differenziamento mielomonocitico, in buon accordo con i risultati morfologici.

Tabella 1. Analisi citofluorimetrica dei marcatori di superficie dopo 4 giorni di trattamento con RA o Nev: intensità media di fluorescenza (AU).

Marcatore	Controllo	Cellule NB4		Cellule HL60	
		RA	Nev	RA	Nev
CD11b	7.2	53.7	10.1	12.1	15.3
CD14	18.3	19.1	23.1	34.3	23.7
CD15	106.5	421.7	196.3	122.5	609.7

Esempio 8 - Alterata espressione dei geni regolatori del ciclo cellulare in cellule di teratocarcinoma F9 esposte alla nevirapina.

La capacità della nevirapina di influenzare la crescita ed il differenziamento cellulare si riflette nell'alterata espressione di geni specifici. La Figura 5A mostra i patterns di espressione di 10 geni,

codificanti cicline (ciclina D1 e D3), inibitori della crescita (p16, p21, p27, Rb-1 e Rb-2/p130), modulatori dell'apoptosi (p53, Bcl2), e proteine costitutive (beta-actina, GAPDH), ricavati mediante RT-PCR semi-quantitativa di RNA estratto da cellule F9 di controllo (ctr), trattate con nevirapina (nev) o con acido retinoico (RA). I risultati, quantificati nella Figura 5B, mostrano che il trattamento con nevirapina influenza l'espressione di geni specifici; i cambiamenti più significativi sono a carico del gene per ciclina D1, la cui espressione è ridotta di circa 7 volte, e del gene p16^{INK4a} che, al contrario, aumenta di circa 8 volte rispetto alle cellule di controllo. Questi due geni sono regolatori chiave della proliferazione e la loro espressione è alterata in molti tipi di tumori. L'espressione di altri geni invece rimane inalterata (beta-actina, GAPDH, p53).



L'alterata espressione di questi geni è da porre in relazione all'arresto della proliferazione ed all'innescio del processo differenziativo cellulare indotto dalla nevirapina.

Esempio 9 - Attività endogena di trascrittasi inversa presente nelle cellule sensibili alla nevirapina.

La presenza dell'attività RT, l'enzima target della nevirapina, è stata rilevata, con un test in-vitro descritto nella sezione Materiali e Metodi, in tutti i tipi cellulari utilizzati in questo lavoro. I dati riassunti nella Figura 6 mostrano che estratti di cellule HL60 (corsia 1), NB4 (2), NIH/3T3 (3), F9 (4) e C2C7 (5) possiedono un'attività RT capace di retrotrascrivere in vitro un RNA con cui sono incubati; il prodotto retrotrascritto non è invece sintetizzato se l'estratto cellulare, e/o l'RNA, sono omessi

Handwritten signature

dall'incubazione (corsie 6-10). Inoltre l'enzima RT endogeno è inibito dalla nevirapina in modo dose-dipendente: il prodotto di cDNA infatti scompare a 100 μ M (corsia 14), ma non a 1 (12) nè a 10 μ M (13). Questi risultati dimostrano che un'attività di RT endogena è presente nelle cellule ed è efficacemente inibita dalla nevirapina ad una concentrazione paragonabile a quella a cui sono state incubate le cellule.

Esempio 10 – prove in vivo dell'attività antitumorale della nevirapina

a) Caratteristiche del ceppo da esperimento e del tumore

Ratti (ceppo): ACI/T imbred (circa 180 gr di peso).

Caratteristiche del tumore: Hepatoma di Morris 3924A. Si tratta di un tumore epatico "fast growing" trapiantato da H.P. Morris su animali imbred ACI/T. Dopo tre settimane dall'inoculo il nodulo tumorale è di circa 10 cm³.

Preparazione delle cellule tumorali da inoculare: le cellule tumorali vengono preparate dall'animale portatore, sacrificato a circa due settimane dall'insorgere del tumore. Il tumore è prelevato chirurgicamente, deposto in una capsula Petri e ripulito dal connettivo e dal tessuto necrotico. Il tessuto tumorale è finemente tagliuzzato, sospeso in soluzione fisiologica sterile ed inoculato nel ratto da esperimento con una siringa da 20 ml usando un ago di largo calibro (250). Usualmente sono iniettati 0,5 ml di sospensione cellulare /coscia. L'attecchimento del tumore è generalmente del 99%.

b) Procedure sperimentali relative all'esperimento con nevirapina

Preparazione NEVIRAPINA: 180 mg/2 ml in DMSO (la soluzione

concentrata di nevirapina è preparata dallo sperimentatore)

Pretrattamento ratti: 11 giorni, con inoculo giornaliero di 0,2 ml/ratto, corrispondente a 18 mg/ratto/giorno.

Inoculo tumore: all'11° giorno di pretrattamento a tre ratti vengono inoculate cellule tumorali per via sottocutanea all'interno di entrambe le cosce. Simile inoculo è effettuato su tre ratti dello stesso ceppo non pretrattati con nevirapina.

Risultati: Dopo 17 giorni dall'inoculo del tumore i tre ratti di controllo (non pretrattati) hanno sviluppato noduli tumorali delle dimensioni di circa 2-4 cm² chiaramente visibili e rilevabili al tatto. I noduli rispondono, per criteri morfologici, a quelli che di routine sono analizzati e tipizzati come epatoma di Morris.

I tre ratti pretrattati al contrario appaiono perfettamente sani: non vi è traccia di formazioni di noduli tumorali né all'osservazione visiva né alla palpazione

Conclusioni: Il pretrattamento con nevirapina impedisce l'attecchimento di un epatoma sperimentalmente indotto su ratti (3/3) di un ceppo geneticamente predisposto allo sviluppo di quello specifico tumore.

Ratti di controllo dello stesso ceppo non pretrattati, inoculati nelle stesse condizioni, sviluppano (3/3) il tumore.

Questi risultati sono in buon accordo con quelli ottenuti *in vitro* utilizzando linee di colture cellulari murine ed umane. Essi permettono inoltre di estendere i risultati ottenuti con cellule e blasti leucemici umani, in cui il fenotipo tumorale viene parzialmente revertito dalla nevirapina, dimostrando che la somministrazione di nevirapina può prevenire la

formazione stessa del tumore in un modello animale *in vivo*. Questa attività anti-tumorale della nevirapina è attribuibile alla sua capacità di inibire l'attività della Trascrittasi Inversa (RT) endogena. I risultati nel loro insieme confermano quindi il ruolo centrale della RT nella trasformazione neoplastica.

Sulla base dei risultati riassunti sopra si può concludere che la RT endogena ha un ruolo nel controllo della proliferazione cellulare e quindi nel processo di trasformazione tumorale. Pertanto secondo la presente invenzione i composti che mostrano attività di inibizione della RT possono essere utilizzati come farmaci antiproliferativi. Queste conclusioni si basano sul fatto che è stato sperimentalmente dimostrato che:

- La nevirapina inibisce l'attività RT endogena delle cellule;
- L'inibizione della RT riduce la crescita cellulare e favorisce il differenziamento delle cellule progenitrici embrionali, normali e tumorali;
- A livello molecolare, il processo differenziativo indotto dalla nevirapina è accompagnato da una estesa riprogrammazione del profilo di espressione di specifici geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare;
- La nevirapina esercita un'efficace azione differenziativa in cellule tumorali, favorendo l'insorgere di fenotipi differenziati, e può pertanto essere vantaggiosamente utilizzata nella terapia antitumorale di leucemie e di tumori solidi;
- Infine, la nevirapina si è dimostrata in grado di accelerare o favorire l'induzione di differenziamento fisiologico in linee cellulari progenitrici (in



questo studio, del muscolo scheletrico), e potrebbe quindi essere impiegata per contrastare la perdita di differenziamento in patologie differenzianti non tumorali.

I composti non nucleosidici secondo l'invenzione, e la nevirapina in particolare, compresi i loro sali e/o derivati farmaceuticamente accettabili, possono essere somministrati, se noti in terapia, nelle forme farmaceutiche comunemente già usate e comunque in combinazione con comuni carriers e/o diluenti e/o solventi e/o eccipienti già utilizzati a questo scopo. La nevirapina, ad esempio può essere in forma di compresse comprendenti da 2,5 a 200 mg di nevirapina, oppure sospensioni comprendenti da 5 a 10 mg/ml di nevirapina, oppure soluzioni intravenose contenenti circa 0,8 mg/ml di nevirapina, unitamente ad un co-solvente adatto a solubilizzare la nevirapina. Le dosi normalmente somministrate a fini terapeutici sono in funzione della tipologia dell'affezione e del paziente da trattare.



Handwritten signature or mark.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di composti inibitori della trascrittasi inversa per la preparazione di composizioni farmaceutiche che contrastano la perdita di differenziamento cellulare in patologie non tumorali.
2. Uso secondo la riv. 1 per la preparazione di composizioni farmaceutiche che contrastano la proliferazione cellulare e favoriscono il differenziamento in patologie tumorali.
3. Uso secondo la riv. 2, in cui le patologie tumorali sono scelte fra leucemie e tumori solidi quali epatoma e teratocarcinoma.
4. Uso secondo le riv. 1 e 2 in cui le patologie, sia tumorali che non tumorali, sono causate da deficit di differenziamento
5. Uso secondo le riv. 1-4 in cui le composizioni comprendono come principio attivo almeno un composto scelto nella classe delle 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine.
6. Uso secondo le riv. 1-4 in cui le composizioni comprendono come principio attivo almeno un composto scelto fra: nevirapina, efavirenz, delavirdine, compresi i relativi sali e/o derivati farmaceuticamente accettabili.
7. Uso secondo la riv. 6 in cui le composizioni farmaceutiche comprendono ulteriormente carriers e/o diluenti e/o solventi e/o eccipienti per la preparazione di composizioni per uso orale, o intravenoso.
8. Uso secondo le riv. 6-7 in cui le composizioni farmaceutiche sono in forma di compresse, sospensioni o soluzioni.

(PV/lm)

3633PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

Milano, 19 agosto 2002

p. SPADAFORA Corrado, LAVIA Patrizia, MATTEI Elisabetta,
NERVI Clara, LORENZINI Rodolfo Nello, PALOMBINI Guglielmo

Il Mandatario


Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



[Handwritten signature]

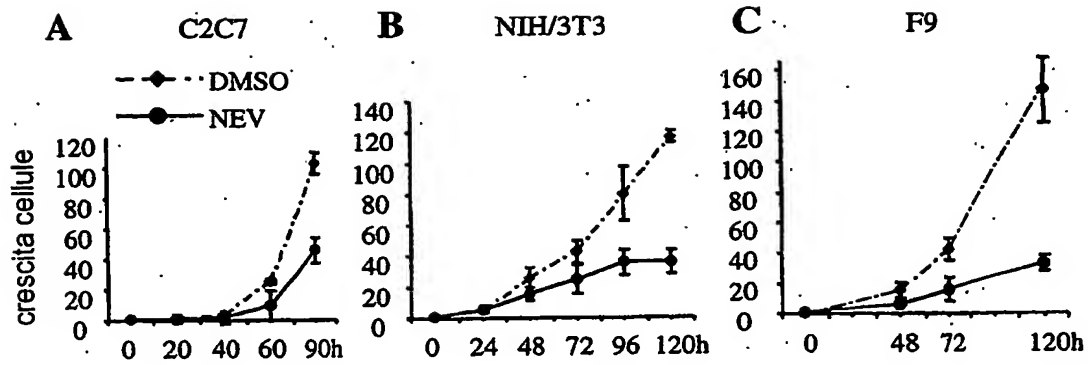


FIGURA 1

MI 2002 A 0 0 1 8 3 3



[Handwritten signature]

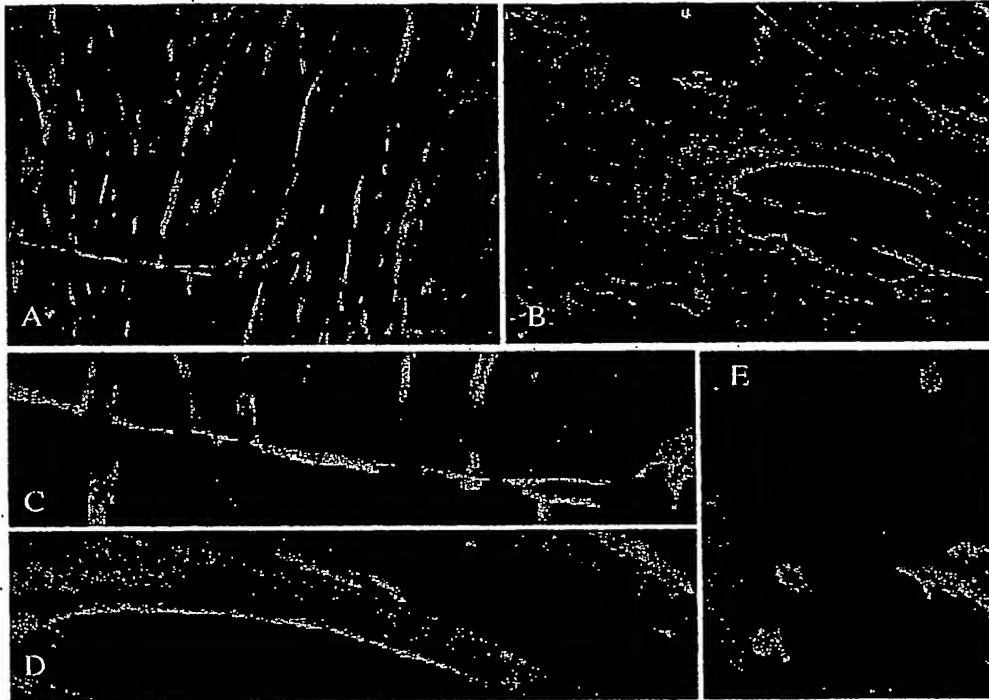


FIGURA 2

MI 2002A 001833



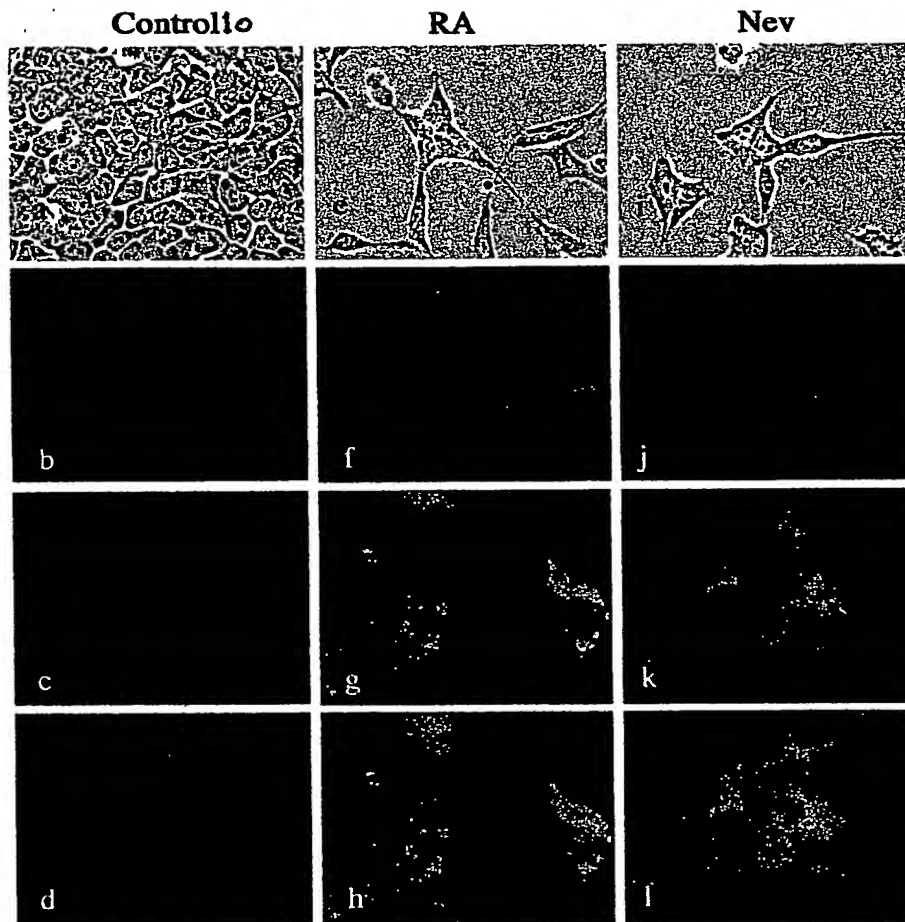
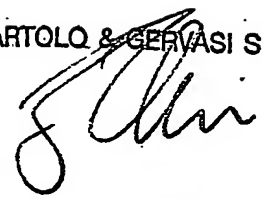


FIGURA 3

MI 2002A 001833

[Handwritten signature]

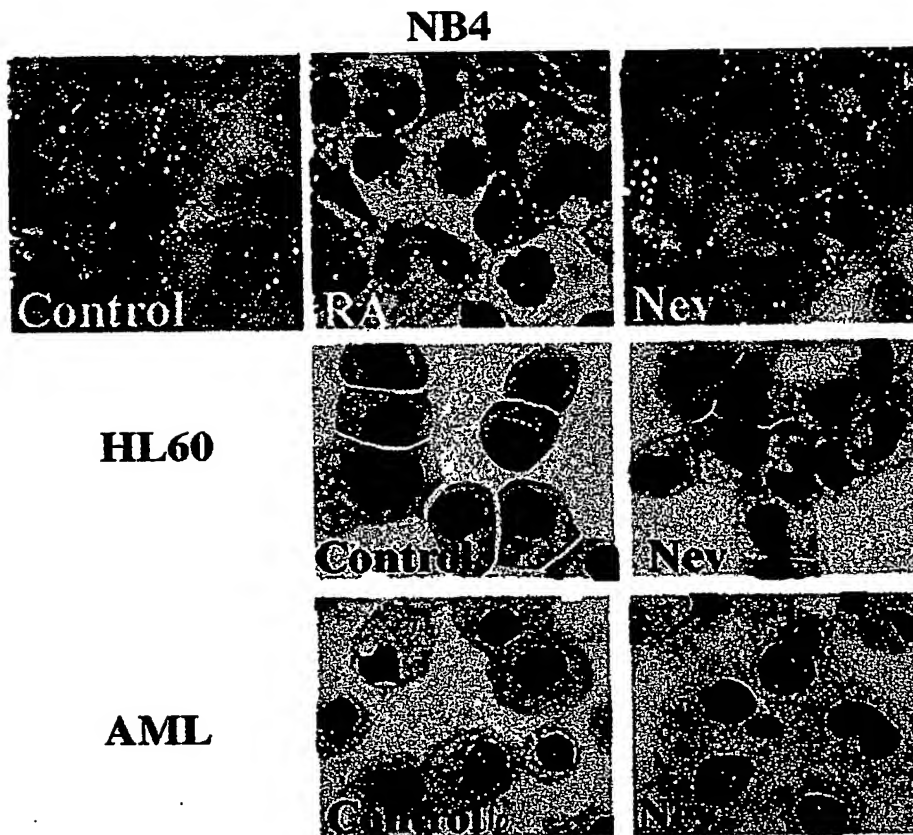


FIGURA 4

MI 2002 A 0 0 1 8 3 3

[Handwritten signature]

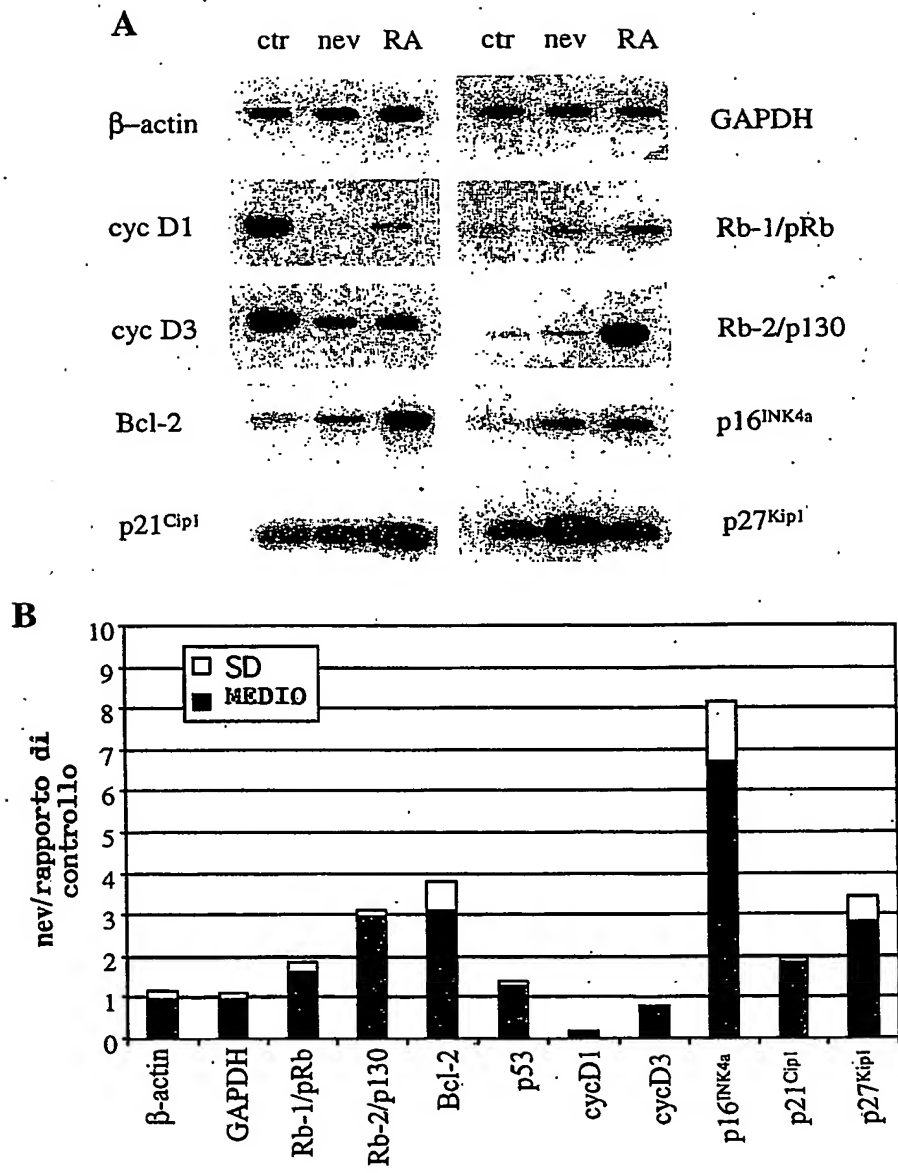


FIGURA 5

MI 2002 A 001833



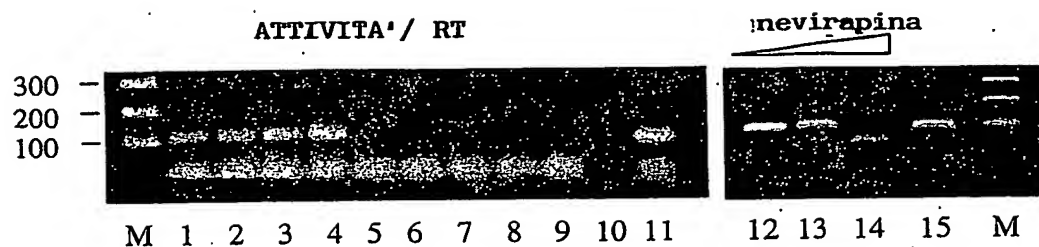


FIGURA 6

MI 2002A 001833